

VERIFIED TRANSLATION OF PCT

35419/97

IN THE MATTER OF an Australian
Application corresponding to
PCT Application PCT/EP97/03571

I, Alan John SPARROW MRSC,
c/o Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England, do solemnly and sincerely declare that I am conversant
with the English and German languages and am a competent
translator thereof, and that to the best of my knowledge and
belief the following is a true and correct translation of the
PCT Application filed under No. PCT/EP97/03571.

Date: 9 December 1998

A. J. Sparrow

A. J. SPARROW

For and on behalf of RWS Group plc

*Certified English
translation of*

WCO

98/03257

Solid supports for analytical measurement methods, their production and their use

5 The invention relates to solid supports for analytical measurement methods which are essentially composed of an inert solid support material on which hydrophilic measurement zones which may be provided with a surface loading are separated from one another by at least one hydrophobic coating, where the number of measurement points applied per cm^2 of the support is greater than or equal to 10. The invention furthermore relates to a process for producing the supports, and to the use of the supports in diagnostic methods, in research looking for active substances, in combinatorial chemistry, in crop protection, in toxicology or in
15 environmental protection.

A main task of research looking for active substances in crop protection or in medicine is to identify novel lead structures and to develop active substances derived from these structures.

20

In classical research looking for active substances, the biological effect of novel compounds has been tested in random screening on the whole organism, for example the plant or the microorganism. Employed for this purpose were complex in vitro and in vivo
25 test methods with which only a few hundred substances could be tested each year.

In this case the biological testing was the limiting factor with respect to the synthetic chemistry.

30

The provision of molecular test systems by molecular and cell biology has led to a drastic change in the situation. These molecular test systems, such as receptor binding assays, enzyme assays or cell-cell interaction assays, can, as a rule, readily be
35 carried out in microtiter plates in reaction volumes of from 50 to 250 μl and can easily be automated. Automation and miniaturization of these test systems permits the sample throughput to be high. This development makes it possible to test large numbers of different chemicals for possible use as lead structure in research looking for active substances.
40

A modern automated test system allows 100,000 or more chemicals to be tested for their biological effect each year in mass screening. Microtiter plate assays are very often used because,
45 as a rule, they entail low costs, are very reliable and have little susceptibility to faults.

In order to be able fully to exploit the efficiency of these test systems, novel solid-phase syntheses have been and are still being developed in combinatorial chemistry.

- 5 Combinatorial chemistry makes it possible to synthesize a wide variety of different chemical compounds, called substance libraries. This is particularly true when combinatorial chemistry makes use of automated solid-phase synthesis (see, for example, review articles I. [sic] Med. Chem. 37 (1994) 1233 and 1385).
- 10 Solid-phase synthesis has the advantage that a large number of compounds can be synthesized, and that by-products and excess reactants can easily be removed, so that elaborate purification of the products is unnecessary.
- 15 The large number of synthesized compounds in combinatorial chemistry means that the efficiency of modern automated test systems can be fully exploited with regard to chemical diversity. Since, however, in contrast to classical active substance synthesis, the chemicals to be investigated are not available in any desired
- 20 amount on synthesis by means of combinatorial chemistry, only a restricted number of test systems can be examined because of the amounts of chemicals required in the test systems.

Another disadvantage of present test systems, for example in re-

25 search looking for active substances, in diagnostic methods, in environmental protection or crop protection, is that the reagents required for many test systems, such as enzymes, antibodies, receptors, fluorescent dyes, radioactively or otherwise labeled ligands, cytokines, activators, inhibitors or other reagents, are

30 costly, difficult to prepare and/or not available in a quantity sufficient for the automated tests.

DE-A 44 35 727 describes an approach for reducing the reagents required for a test.

35

The disadvantage of this process is that the support for the measurements must first be produced in an elaborate multistage process.

- 40 Another disadvantage is that the reactions which can be carried out with this support material are confined to reactions linked to solid phases, such as reactant binding between antibodies, antigens, haptens or nucleic acids. It is not possible with this method to carry out reactions in solution.

It is an object of the present invention to develop a novel analytical measurement method which can be carried out without the stated disadvantages and provide it for research looking for active substances, diagnostic methods, environmental protection, crop protection, toxicology or combinatorial chemistry.

We have found that this object is achieved by using the solid support described at the outset for the measurement method.

- 10 It has been found that the surface tension which hinders further miniaturization of the present microtiter plate technique to ever smaller reaction cavities (= wells), because thereby forces such as adhesion of the reaction liquid to the surface of the microtiter plates or the capillary forces are of increasing importance, and thus make it impossible to fill the reaction cavities and thus carry out a measurement, in very small microtiter plate wells, can be utilized advantageously for the supports according to the invention.
- 20 Hydrophilic measurement zones on the support mean areas on the support on which or in which the measurement is carried out after application of the reaction liquid and thus of the reactants (see number 2 in Figures 1, 3 and 4). They thus correspond to the wells in microtiter plates and are referred to hereinafter as
- 25 "measurement zones or measurement points".

The hydrophilic measurement zones on the support are advantageously surrounded by a hydrophobic zone (see number 1 in Figures 1 to 4). This hydrophobic zone can be composed of at least one hydrophobic coating which covers the support completely or only partly with discontinuities. These discontinuities (see number 5 in Figures 1 to 4) are advantageously hydrophilic.

Figures 1 to 4 serve to illustrate the supports according to the invention by way of example.

The measurement zones, and the hydrophobic zones which separate them from one another (see number 1 in Figures 1 to 4), can be applied, for example, by microlithography, photoetching, microprinting or a micropunch technique or can be sprayed on using a mask technique. Photochemical processes which can be used to make the surfaces of plates or rolls specifically hydrophobic at particular points and hydrophilic at other points are known from the techniques for producing printing plates. It is possible with this technique to produce, for example, a grid of several thousand regularly arranged hydrophilic measurement zones (see number

number 1 in Figures 1 to 4), in a simple manner on a support, eg. on a glass or metal plate. This may entail firstly one or more hydrophobic coatings being applied to the support, and subsequently the measurement zones being applied to the required points or, conversely, initially the hydrophilic measurement zones and then the hydrophobic zones, or both simultaneously, being applied. It is also possible to apply a plurality of hydrophilic measurement zones to the same point.

10 Figure 2 depicts by way of example a support according to the invention having the size of a microtiter plate.

The measurement zones can have any desired shape, with circular measurement zones being preferred.

15

The hydrophobic coating or coatings may be applied coherently to the support or else be provided with discontinuities of any design. They may also be in the form of separate zones around the measurement zones, with hydrophobic rings separating the hydrophilic measurement zones from one another being preferred.

20

The hydrophobic coating or coatings are intended to prevent the measurement zones spreading into one another and thus to make accurate measurement of individual reaction mixtures possible.

25

It is possible in principle to apply any desired number of measurement points onto a support, but the number of measurement points per cm^2 is preferably greater than or equal to 10, particularly preferably greater than or equal to 15 and very particularly preferably greater than or equal to 20. Moreover, the reaction volumes applied are from a few nl up to some μl , with volumes of less than 5 μl being preferred, and of less than or equal to 1 μl being particularly preferred.

30

35 The measurement points can be applied in any desired grids to the support, and square or rectangular grids are preferred.

The inert solid support may consist of a level, planar plate of a block of the same type or of a sheet of any desired shape and

40

size, which may have small depressions (see Figure 4) at the measurement zone points, with flat supports (see Figure 3) being preferred. Rectangular or square supports are preferred, and

rectangular supports with the size of a standard microtiter plate (127.5 mm x 85.5 mm) or integral multiples of microtiter plates,

45

which can be larger or smaller, for example the Terasaki plates (81 mm x 56 mm, 60 measurement points), are particularly pre-

vention has the advantage that all the peripherals of automated microtiter plate technology can be used without alteration.

The support may consist, for example, of materials such as glass, ceramic, quartz, metal, stone, wood, plastic, rubber, silicon, germanium or porcelain. The materials can be used in pure form, as mixtures, alloys or blends or in various layers or after coating with, for example, a plastic or a paint for producing the supports according to the invention. Transparent supports made of quartz, glass, plastic, germanium or silicon, which are suitable for all visual tests such as microscopic, camera-assisted and laser-assisted tests, are preferably produced.

Suitable transparent plastics are all amorphous plastic materials which [lacuna] in a single-phase or multiphase manner with identical refractive index as polymers of acrylonitrile/butadiene/styrene or in a multiphase manner with different refractive index, in which the domains of the plastic components form zones which are smaller than the wavelength of light, such as the block copolymers of polystyrene and butadiene (polystyrene/butadiene blends).

Particularly suitable transparent plastics which may be mentioned in this connection are polystyrene, styrene/acrylonitrile, polypropylene, polycarbonate, PVC (= polyvinyl chloride), poly(methyl methacrylate), polyesters, silicones, polyethylene/acrylate, polylactide or cellulose acetate, cellulose propionate, cellulose butyrate or mixtures thereof. Silicon or germanium supports are particularly suitable for applications in which detection or induction of the reaction using near infrared light is necessary.

The support according to the invention may also be designed in the form of a conveyor belt which, when the assays are automated, can move past the charging, incubation or detection stations.

35

One process for producing the supports according to the invention starts, for example, from ceramic, quartz or glass plates. The support is for this purpose expediently first cleaned with a cleaner, for example an alcohol, an alkaline cleaner or an acidic cleaner such as Reacalc® (which contains, according to the supplier Chemotec GmbH, phosphoric acid and surfactants). The cleaning can advantageously be improved by carrying it out in an ultrasonic bath. After cleaning, the support is dried, immediately or after rinsing with water and/or alcohol or with an alcohol/water mixture. The hydrophobic coating of the support takes place, for example, with a 1 % strength hexadecyltrimethoxysilane

technique. The punch is briefly pressed on the glass slide to apply the 1 % strength hexadecyltrimethoxysilane solution. The support is subsequently dried. The glass support is advantageously dried at elevated temperatures, ie. above 80°C. The support is preferably rinsed once again after drying to remove excess hexadecyltrimethoxysilane, for example with an alcohol/water mixture such as isopropanol/H₂O (9:1).

This punch technique may be used to apply an additional surface loading in the region of the hydrophilic measurement points. This surface loading can be generated, for example, by applying proteins, acidic or basic polymers such as polylysine or acidic or basic molecules.

Methods suitable for applying sample material and reagents are all those able to meter amounts of liquid from a few nl to a few µl, such as techniques used in ink jet printers (see DE-A 40 24 544) or in flow cytometry, in cell sorters (Horan, P.K., Wheelless, L.L., Quantitative Single Analysis and Sorting, Science 198 (1977) 149-157). Drop formation can in this case take place by piezoelectric drop formation (ultrasound), piezoelectric drop ejection or ejection by evaporation (ink jet technique). It is possible to use systems with permanent drop production or systems which produce drops on demand.

25

These techniques can be used to place individual droplets in an accurately metered and targeted manner on the individual hydrophilic measurement points of the multianalysis surface of the support by, for example, moving the support under one or more nozzles, which are arranged in parallel, in accordance with the rhythm of the metered liquid and in accordance with the preset grid. It is also possible likewise to move the metering device, for example consisting of at least one nozzle, over the support in accordance with the rhythm of the metered liquid and in accordance with the preset grid.

It is possible with these techniques if necessary to place different reagents and/or individual cells on the predetermined sites (measurement points) on the support surface and bring about reaction thereof. It is advantageous that, with the small volumes preferred according to the invention, in the range from a few nanoliters to a few microliters, mixing of the reactants by diffusion takes place very quickly so that no special mechanical mixing device is necessary. It is also possible, before the addition of liquid droplets for carrying out the actual analysis, for certain ligands, or proteins or nucleic acids, to be present on

the support in adsorbed or chemically bound form before metering in the measurement samples and the reagents.

Further advantages of the supports according to the invention are the saving of substances such as chemicals to be tested, enzymes, cells or other reactants, of time through a further increase in parallel reaction mixtures, which are automated where appropriate, of space and staff requirements, due to further miniaturization of the reaction mixtures and thus finally also of money.

10

The droplets placed on the supports may also be applied in the form of gel droplets which subsequently solidify where appropriate and thus reduce evaporation of the reaction liquid.

15 Evaporation of the reaction liquid (see number 3 in Figures 3 and 4) can also be reduced by coating with a hydrophobic liquid (see number 4 in Figures 3 and 4), in which case the hydrophobic coating or coatings act like an anchor (Figure 3 and 4).

Low-viscosity oils such as silicone oils are preferably used for the coating.

Evaporation can also be reduced by incubating the supports in an atmosphere which is virtually saturated with water vapor.

25 Reduction in evaporation is likewise possible by cooling the supports.

Evaporation can be reduced by using single elements of those mentioned or combinations thereof.

30

The supports according to the invention are suitable in principle for all analytical methods now carried out in microtiter plates, such as colorimetric, fluorimetric or densitometric methods. It is possible in these cases to use and measure light scattering, turbidity, wavelength-dependent light absorption, fluorescence, luminescence, raman scattering, ATR (= Attenuated Total Reflection), radioactivity, isotope labeling, pH shifts or ion shifts, advantageously alone or in combination, to mention only a few of the possible measured quantities here.

40

Analytical methods which can be carried out on the supports according to the invention and which may be mentioned here are the binding of antibodies to antigens, the interaction between receptors and ligands, the specific cleavage of substrate molecules by enzymes, the polymerase chain reaction (PCR), agglutination tests or the interaction between different or identical cell types such

assays, erythrocyte or platelet aggregation assays, agglutination assays with latex beads, ELISA (= Enzyme-linked immunosorbent assay) or RIA (= Radioimmunoassay).

5 The supports according to the invention can be employed, for example, in diagnostic methods, in research looking for active substances, in combinatorial chemistry, in crop protection, in toxicology, in environmental protection, for example for cytotoxicological tests, in medicine or in biochemistry.

10

The supports according to the invention are particularly suitable for mass screening.

The supports according to the invention are particularly suitable
15 for all modern image-acquiring and image-analyzing systems.

The following examples serve to illustrate the invention further without restricting it in any way.

20 Example 1

Production of a support according to the invention from a glass slide

25 Firstly, the glass slide was cleaned with a 20 % strength aqueous solution of an acidic cleaner (Reacalc[®] supplied by Chemotec GmbH) in an ultrasonic immersion bath for 10 minutes. The glass slide was subsequently rinsed with water and then with absolute ethanol and dried at about 23°C.

30

A micropunch was used to apply the hydrophobic coating in the form of hydrophobic rings (see Figure 1 to 4) on the hydrophilic support. The hydrophobic layer was applied using a 1 % strength hexadecyltrimethoxysilane solution in isopropanol/H₂O (9:1). The

35 punch was dipped in the silane solution and then briefly, for about 5 sec, pressed on the support, and then the support was dried at 100°C for 15 minutes. Excess silane solution was removed from the support by immersing the support in isopropanol/H₂O (9:1) for about 1 minute. Two types of punches were used to apply 12
40 and 25, respectively, measurement points per square centimeter.

Example 2

Protease inhibitor assay with the supports according to the invention

A protease inhibitor assay was carried out using a support produced by the process described in Example 1.

- 10 96 samples each comprising 100 nl of a solution of casein labeled with fluorescein isothiocyanate (20 µg/ml) in 10 mM tris/HCl buffer (pH 8.5) were applied, in a chamber with a relative humidity exceeding 95 % using a micrometering system supplied by Microdrop, Norderstedt, to a slide produced as described above. The
- 15 reaction droplets were arranged in 8 rows and 12 columns in a 2 x 2 mm grid in accordance with the hydrophobic zones (= barrier layers) applied by the punch. The width of the hydrophobic rings was 0.4 mm in each case.
- 20 Subsequently, 1 nl of each of various protease inhibitors in a concentration of 1 mM in 10 mM tris/HCl buffer (pH 8.5) was added to the reaction samples using the Microdrop apparatus. Addition took place precisely into the fluorescent-labeled casein solution which had previously been applied. One nanoliter of 10 mM tris/
- 25 HCl buffer (pH 8.5) was used as control.

Finally, 10 nl of the protease trypsin in a concentration of 10 mg/ml in tris/HCl buffer (pH 8.5) were added to the reaction.

- 30 The reaction droplets were subsequently covered either with mineral oil, silicone oil or liquid paraffin, which was applied using the microdrop metering system, to reduce evaporation.

- After incubation for 30 minutes, the assay was measured. This was
- 35 done using an inverted fluorescence microscope for excitation, from the underside of the slide, with linearly polarized light in the range from 450 to 485 nm and for detection of fluorescence in the range from 515 to 530 nm. A coolable CCD camera in front of which there was a polarization filter which could be rotated by a
 - 40 motor was used for detection.

The anisotropy of polarization of the casein molecules was determined using the following equations:

$$A = \frac{I_{\text{perpendicular}} - I_{\text{parallel}}}{I_{\text{perpendicular}} + 2 \times I_{\text{parallel}}} \quad (\text{I})$$

$$A = \frac{I_{\text{perpendicular}} - I_{\text{parallel}}}{I_{\text{perpendicular}} + I_{\text{parallel}}} \quad (\text{II})$$

where:

10

A is the anisotropy

P is the polarization

I_{parallel} is the measured intensity of the fluorescent light on polarization parallel to the polarization of the exciting light and

15

$I_{\text{perpendicular}}$ is the measured intensity of the fluorescent light with crossed polarization filters.

The anisotropy is a measure of the rotational diffusion coefficient of molecules and can be employed to estimate the hydrodynamic sizes of molecules (G. Weber, Biochemie, Vol. 51, 1952, 145-155).

On cleavage of the protein labeled with fluorescein isothiocyanate by the protease, a polarization in the range from 50 to 75×10^{-3} was measured. On inhibition of the protease trypsin, the measured polarization was greater than 150×10^{-3} .

For parallel analysis of all 96 reaction mixtures, the complete measurement field with the 96 points was covered at one time with a lens of a stereo magnifier and was analyzed using an image-processing program.

Example 3

35

Protease inhibitor assay with 1536 parallel measurement points

A trypsin inhibitor assay was carried out as described in Example 2 with 1536 parallel measurement points on the size of a 40 microtiter plate (see Figure 2).

We claim:

1. A solid support for analytical measurement methods which is essentially composed of an inert solid support material on which hydrophilic measurement zones which may be provided with a surface loading are separated from one another by at least one hydrophobic coating, where the number of measurement points applied per cm² of the support is greater than or equal to 10.
2. A solid support as claimed in claim 1, wherein the hydrophilic measurement zones are separated from one another by at least one continuous hydrophobic coating.
3. A solid support as claimed in claim 1, wherein the hydrophilic measurement zones applied to the support are separated from one another by non-continuous hydrophobic zones.
4. A support as claimed in any of claims 1 to 3, wherein the support material used is glass, ceramic, quartz, metal, stone, plastic, rubber, silicon or porcelain.
5. A support as claimed in any of claims 1 to 4, wherein a transparent support material selected from the group of glass, quartz, silicon or plastic is used.
6. A process for producing a support as claimed in any of claims 1 to 5, which comprises providing the support with at least one hydrophobic coating, and applying the hydrophilic measurement zones by microlithography, photoetching, microprinting or a micropunch technique.
7. A process for producing a support as claimed in any of claims 1 to 5, which comprises providing a hydrophilic or hydrophilized support with at least one hydrophobic coating by microlithography, photoetching, microprinting or a micropunch technique so as to produce hydrophilic measurement zones which are separated from one another.
8. A process for producing a support as claimed in claim 6 or 7, wherein a surface loading is additionally applied in the hydrophilic measurement zones on the support.
9. An analytical measurement method which comprises liquid analysis samples which may, where appropriate, be covered with a hydrophobic layer being applied and analyzed in the

hydrophilic measurement zones on a support as claimed in any of claims 1 to 5.

10. An analytical measurement method as claimed in claim 9,
5 wherein the analytical measurement is carried out in an atmosphere which is virtually saturated with water vapor.
11. An analytical measurement method as claimed in claim 9 or 10,
10 wherein the analytical measurement is carried out while cooling the support.
12. The use of a support as claimed in any of claims 1 to 5 in
15 diagnostic methods, in research looking for active substances, in combinatorial chemistry, in crop protection, in toxicology or in environmental protection.

20

25

30

35

40

Solid supports for analytical measurement methods, their production and their use

5 Abstract

The invention relates to solid supports for analytical measurement methods which are essentially composed of an inert solid support material on which hydrophilic measurement zones, separated from one another by a hydrophobic coating, where at least 10 measurement points are applied to the support per cm^2 . The invention furthermore relates to a process for producing the supports, and to the use of the supports in diagnostic methods, in research looking for active substances, in combinatorial chemistry, in 15 crop protection, in toxicology or in environmental protection.

20

25

30

35

40

45

FIG.1

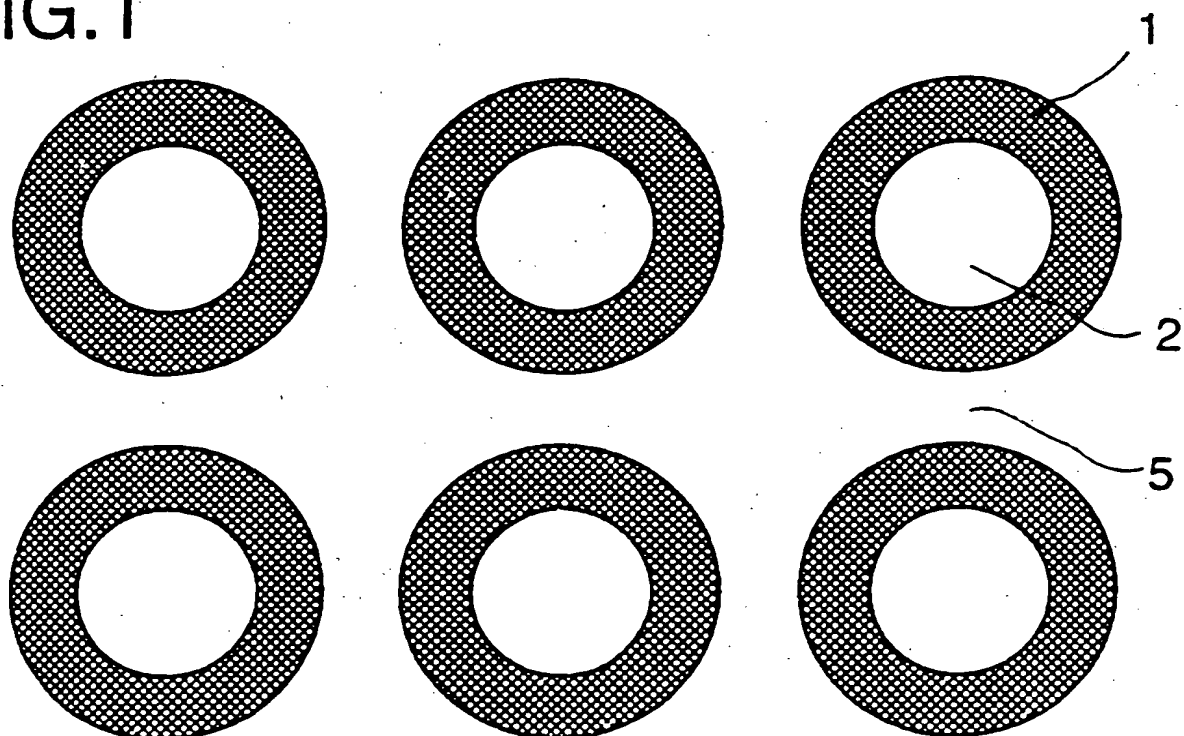


FIG.2

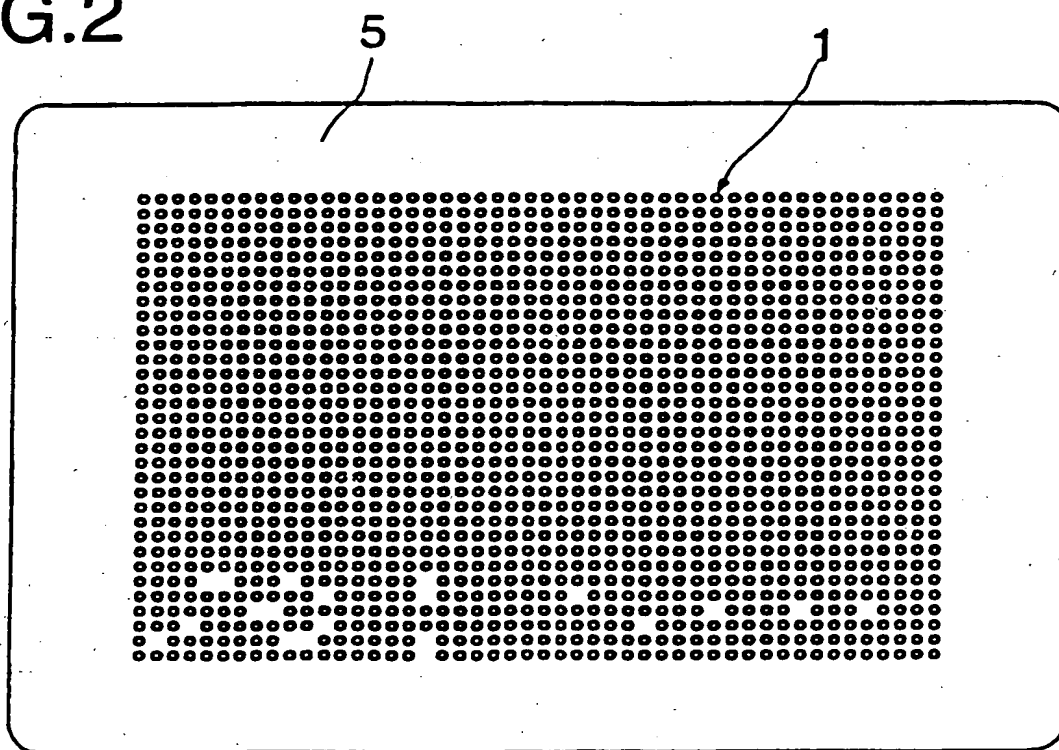


FIG.3

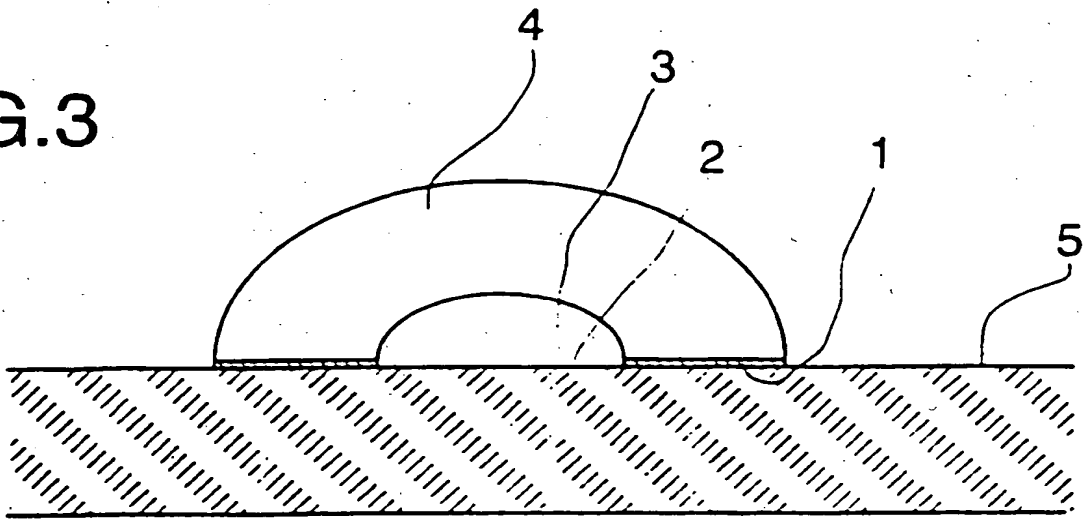
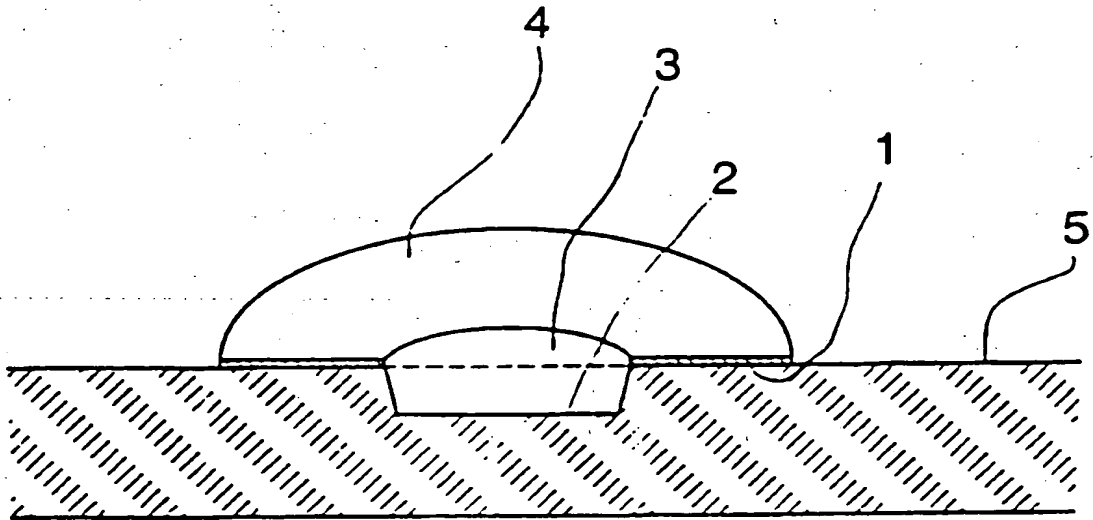


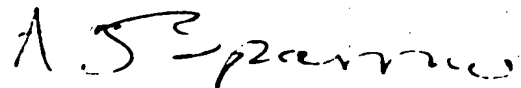
FIG.4



IN THE MATTER OF an Australian
Application corresponding to
PCT Application PCT/EP97/03571

I, Alan John SPARROW MRSC,
c/o Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshir ,
England, do solemnly and sincerely declare that I am conversant
with the English and German languages and am a competent
translator thereof, and that to the best of my knowledge and
belief the following is a true and correct translation of the
am nded sheets of the PCT Application filed under No.
PCT/EP97/03571.

Date: 9 December 1998



A. J. SPARROW

For and on behalf of RWS Group plc

We claim:

1. A solid support for analytical measurement methods which is essentially composed of an inert solid support material on which hydrophilic measurement zones which may be provided with a surface loading are separated from one another by at least one non-continuous hydrophobic coating, where the number of measurement points applied per cm^2 of the support is greater than or equal to 10.
2. A solid support as claimed in claim 1, wherein the hydrophilic measurement zones applied to the support are separated from one another by non-continuous hydrophobic zones in the form of rings.
3. A support as claimed in claim 1 or 2, wherein the support material used is glass, ceramic, quartz, metal, stone, plastic, rubber, silicon or porcelain.
4. A support as claimed in any of claims 1 to 3, wherein a transparent support material selected from the group of glass, quartz, silicon or plastic is used.
5. An analytical measurement method which comprises applying liquid analysis samples in the hydrophilic measurement zones of a support as claimed in any of claims 1 to 4, overlaying the hydrophilic measurement zones with a hydrophobic liquid and performing the analysis.
6. An analytical measurement method as claimed in claim 5, wherein the analytical measurement is carried out in an atmosphere which is virtually saturated with water vapor.
11. [sic] An analytical measurement method as claimed in claim 5 or 6, wherein the analytical measurement is carried out while cooling the support.
12. [sic] The use of a support as claimed in any of claims 1 to 4 in diagnostic methods, in research looking for active substances, in combinatorial chemistry, in crop protection, in toxicology or in environmental protection.

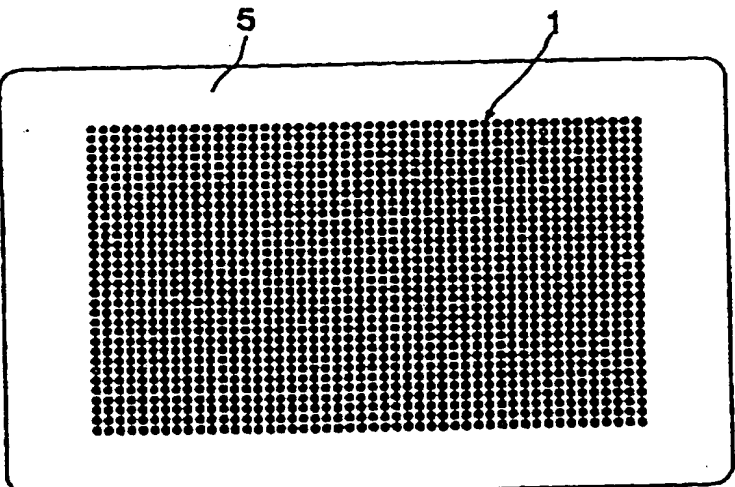
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



24736

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B01J 19/00, B01L 3/00, C07K 1/04, C07H 21/00, C03C 17/30		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/03257
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Januar 1998 (29.01.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03571		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juli 1997 (07.07.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 28 928.9 18. Juli 1996 (18.07.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIPPEL, Heinz [DE/DE]; Im Eichenbühl 24, D-64625 Bensheim (DE). KELLER, Harald [DE/DE]; Dammtueckerweg 29, D-67069 Ludwigshafen (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT, D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Title: SOLID SUPPORTS FOR ANALYTICAL MEASURING PROCESSES, A PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND THEIR USE			
(54) Bezeichnung: FESTE TRÄGER FÜR ANALYTISCHE MESSVERFAHREN, EIN VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE IHRE VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns solid supports (5) for analytical measuring processes, said supports being substantially composed of an inert solid carrier material on which hydrophilic measurement regions (2) are separated from one another by a hydrophobic coating (1), at least ten measuring points per cm² being applied to the support. The invention further concerns a process for preparing these supports, and their use in the fields of diagnosis, active substance screening, combinatorial chemistry, plant protection, toxicology and environmental protection.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft feste Träger (5) für analytische Messverfahren, die im wesentlichen aufgebaut sind aus einem inerten festen Trägermaterial, auf dem hydrophile Messbereiche (2) durch eine hydrophobe Beschichtung (1) voneinander getrennt sind, wobei mindestens 10 Messpunkte pro cm² auf dem Träger aufgebracht sind. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Träger, sowie die Verwendung der Träger in der Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie oder im Umweltschutzbereich.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Feste Träger für analytische Meßverfahren, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft feste Träger für analytische Meßverfahren, die im wesentlichen aufgebaut sind aus einem inerten festen Trägermaterial, auf dem hydrophile Meßbereiche, die gegebenen-

10 falls mit einer Oberflächenladung versehen sind, durch mindestens eine hydrophobe Beschichtung voneinander getrennt sind, wobei auf dem Träger größer oder gleich 10 Meßpunkte pro cm² aufgebracht sind. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstel-

15 stik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie oder im Umweltschutzbereich.

Eine Hauptaufgabe der Wirkstoffsuchforschung im Pflanzenschutz

20 oder in der Medizin ist die Identifizierung neuer Leitstrukturen und die Entwicklung von Wirkstoffen, die aus diesen Strukturen hervorgehen.

In der klassischen Wirkstoffsuchforschung wurde die biologische

25 Wirkung neuer Verbindungen in einem Zufalls-Screening am ganzen Organismus beispielsweise der Pflanze oder dem Mikroorganismus getestet. Dabei wurden komplexe In-vitro- und In-vivo-Testmethoden eingesetzt, mit denen pro Jahr nur einige hundert Substanzen getestet werden konnten.

30 Die biologische Testung war dabei gegenüber der Synthesechemie der limitierende Faktor.

Durch die Bereitstellung molekularer Testsysteme, die in der

35 Molekular- und Zellbiologie entwickelt wurden, hat sich die Situation drastisch verändert. Diese molekularen Testsysteme wie beispielsweise Rezeptorbindungsassays, Enzymassays oder Zell-Zellinteraktionsassays lassen sich in der Regel gut in Mikrotiterplatten in Reaktionsvolumen zwischen 50 bis 250 µl durch-

40 führen und einfach automatisieren. Die Automatisierung und Miniatürisierung dieser Testsysteme ermöglicht einen hohen Proben-durchsatz. Durch diese Entwicklung lassen sich große Zahlen verschiedener Chemikalien auf eine mögliche Verwendung als Leitstruktur in der Wirkstoffsuchforschung testen.

45

Ein modernes automatisiertes Testsystem ermöglicht in einem Massenscreening die Prüfung von 100.000 und mehr Chemikalien pro Jahr auf ihre biologische Wirkung. Mikrotiterplattenassays werden sehr häufig verwendet, da sie in der Regel geringe Kosten verursachen, sehr sicher und wenig störanfällig sind.

Um die Leistungsfähigkeit dieser Testsysteme voll ausschöpfen zu können, wurden und werden immer neue Festphasensynthesen in der kombinatorischen Chemie entwickelt.

10

Die kombinatorische Chemie ermöglicht die Synthese einer breiten Vielfalt unterschiedlicher chemischer Verbindungen, sogenannter Substanzbibliotheken. Dies gilt insbesondere, wenn sich die kombinatorische Chemie der automatisierten Festphasensynthese bedient (s. z.B. Übersichtsartikel I. Med. Chem. 1994, 37, 1233 und 1994, 37, 1385). Die Synthese an der Festphase hat den Vorteil, daß eine große Vielzahl an Verbindungen synthetisiert werden können und daß Nebenprodukte und überschüssige Reaktanten leicht entfernt werden können, so daß eine aufwendige Reinigung der Produkte nicht notwendig ist.

Durch die Vielzahl der synthetisierten Verbindungen in der kombinatorischen Chemie kann die Leistungsfähigkeit moderner automatisierter Testsysteme von Seite der Chemikalienvielfalt voll ausgenutzt werden. Da aber im Gegensatz zur klassischen Wirkstoffsynthese die zu untersuchenden Chemikalien bei der Synthese mittels kombinatorischer Chemie nicht in beliebiger Menge zur Verfügung stehen, kann aufgrund der erforderlichen Chemikalienmengen in den Testsystemen nur eine eingeschränkte Zahl von Testsystemen geprüft werden.

Ein weiterer Nachteil der vorhandenen Testsysteme beispielsweise in der Wirkstoffsuchforschung, in der Diagnostik, im Umweltschutz oder Pflanzenschutz ist, daß für viele Testsysteme die benötigten Reagentien wie beispielsweise Enzyme, Antikörper, Rezeptoren, Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktiv oder sonstig markierte Liganden, Cytokine, Aktivatoren, Inhibitoren oder sonstige Reagentien teuer, schwer herstellbar sind und/oder nicht in ausreichender Menge für die automatisierten Tests zur Verfügung stehen.

40

In DE-A 44 35 727 wird ein Ansatz zur Reduktion der für einen Test benötigten Reagentien beschrieben.

Nachteil dieses Verfahrens ist, daß der Träger für die Messungen erst aufwendig in einem mehrstufigen Verfahren hergestellt werden muß.

Ein weiterer Nachteil ist, daß die Reaktionen, die mit diesem Trägermaterial durchgeführt werden können, auf festphasengebundene Reaktionen wie die Reaktantenbindung zwischen Antikörpern, Antigenen, Haptenen oder Nucleinsäuren beschränkt sind. Reaktionen in Lösung können mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

Es bestand daher die Aufgabe, ein neues analytisches Meßverfahren, das ohne die genannten Nachteile durchführbar ist, zu entwickeln und für die Wirkstoffsuchforschung, die Diagnostik, den Umweltschutz, den Pflanzenschutz, der Toxikologie oder für die kombinatorische Chemie zur Verfügung zu stellen.

Die gestellte Aufgabe konnte dadurch gelöst werden, daß man den eingangs beschriebenen festen Träger für das Meßverfahren verwendet.

Es wurde gefunden, daß die Oberflächenspannung, die einer weiteren Miniaturisierung der vorhandenen Mikrotiterplattentechnik zu immer kleineren Reaktionslöchern (= Wells) hin im Wege steht, da durch sie in sehr kleinen Mikrotiterplattenvertiefungen Kräfte wie die Adhäsion der Reaktionsflüssigkeit an die Oberfläche der Mikrotiterplatten oder die Kapillarkräfte eine immer größere Rolle spielen und so eine Befüllung der Reaktionslöcher und damit eine Messung unmöglich machen, für die erfindungsgemäßen Träger vorteilhaft genutzt werden kann.

Unter hydrophilen Meßbereichen des Trägers sind Gebiete des Trägers zu verstehen, auf denen bzw. in denen nach Aufbringung der Reaktionsflüssigkeit und damit der Reaktanten die Messung durchgeführt wird (siehe Nummer 2 in den Figuren 1, 3 und 4). Sie entsprechen damit den "Wells" bzw. den Vertiefungen der Mikrotiterplatten und werden nachstehend als "Meßbereiche oder Meßpunkte" bezeichnet.

Die hydrophilen Meßbereiche des Trägers sind vorteilhaft von einem hydrophoben Bereich (siehe Nummer 1 in den Figuren 1 bis 4) umgeben. Dieser hydrophobe Bereich kann aus mindestens einer hydrophoben Beschichtung aufgebaut sein, die den Träger vollständig oder nur teilweise mit Unterbrechungen bedeckt. Diese Unterbrechungen (siehe Nummer 5 in den Figuren 1 bis 4) sind vorteilhafterweise hydrophil.

Die Figuren 1 bis 4 dienen der beispielhaften Verdeutlichung der erfindungsgemäßen Träger.

Die Meßbereiche sowie die sie voneinander trennenden hydrophoben Bereiche (siehe Nummer 1 in den Figuren 1 bis 4) können beispielsweise durch Mikrolithographie-, Photoätz-, Mikrodruck- oder Mikrostempeltechnik aufgebracht werden oder mit Hilfe einer Maskentechnik aufgesprüht werden. Aus der Herstellungstechnik von Druckplatten sind photochemische Verfahren bekannt, mit denen Oberflächen von Platten oder Walzen gezielt an bestimmten Stellen hydrophob und an anderen Stellen hydrophil gemacht werden können. Mit dieser Technik lassen sich beispielsweise auf einfache Weise auf einem Träger, z.B. auf einer Glas- oder Metallplatte, ein Raster von mehreren Tausend regelmäßig angeordneten hydrophilen Meßbereichen (siehe Nummer 2 in den Figuren 1, 3 und 4), umgeben von hydrophoben Begrenzungen (siehe Nummer 1 in den Figuren 1 bis 4), herstellen. Dabei können zunächst ein oder mehrere hydrophobe Beschichtungen auf den Träger aufgezogen werden und anschließend die Meßbereiche an den gewünschten Stellen aufgebracht werden oder umgedreht zunächst die hydrophilen Meßbereiche und dann die hydrophoben Bereiche oder beides gleichzeitig aufgezogen werden. Es können auch mehrfach hydrophile Meßbereiche an die gleiche Stelle aufgetragen werden.

Figur 2 gibt beispielhaft einen erfindungsgemäßen Träger in Größe einer Mikrotiterplatte wieder.

Die Meßbereiche können eine beliebige Form haben, bevorzugt sind runde Meßbereiche.

Die hydrophobe Beschichtung oder Beschichtungen können zusammenhängend auf den Träger aufgebracht sein oder aber mit beliebig gestalteten Unterbrechungen versehen sein. Sie können auch als separate Bereiche um die Meßbereiche liegen, bevorzugt sind hydrophobe Ringe, die die hydrophilen Meßbereiche voneinander trennen.

Die hydrophobe Beschichtung bzw. Beschichtungen sollen das Verlaufen der Meßbereiche ineinander verhindern und so eine exakte Messung einzelner Reaktionsansätze ermöglichen.

Prinzipiell ist es möglich, jede beliebige Anzahl von Meßpunkten auf einen Träger aufzubringen, bevorzugt sind größer oder gleich 10 Meßpunkte pro cm^2 , besonders bevorzugt sind größer oder gleich 15 Meßpunkte pro cm^2 , ganz besonders bevorzugt sind größer oder gleich 20 Meßpunkte pro cm^2 . Dabei werden Reaktionsvolumina von wenigen nl bis zu einigen μl aufgetragen, bevorzugt werden Volumina kleiner 5 μl , besonders bevorzugt kleiner oder gleich 1 μl , aufgetragen.

Die Meßpunkte können in beliebigen Rastern auf den Träger aufgebracht werden, bevorzugt sind quadratische oder rechteckige Raster.

- 5 Der inerte feste Träger kann aus einer ebenen, planaren Platte eines eben solchen Blockes oder einer Folie beliebiger Form und Größe bestehen, die gegebenenfalls kleine Mulden (siehe Figur 4) an den Stellen der Meßbereiche haben kann, bevorzugt sind plane Träger (siehe Figur 3). Bevorzugt sind rechteckige oder quadratische Träger, besonders bevorzugt sind rechteckige Träger in Größe 10 einer Standardmikrotiterplatte (127,5 mm x 85,5 mm) oder ganzzahlige Vielfache der Mikrotiterplatten, die größer oder kleiner sein können wie beispielsweise die sogenannten Terasaki-Platten (81 mm x 56 mm, 60 Meßpunkte). Die bevorzugte Größe der 15 erfindungsgemäßen Träger hat den Vorteil, daß die gesamte Peripherie der automatisierten Mikrotiterplattentechnik ohne Umbau verwendet werden kann.

- Der Träger kann beispielsweise aus Materialien bestehen wie Glas, 20 Keramik, Quarz, Metall, Stein, Holz, Kunststoff, Gummi, Silicium, Germanium oder Porzellan. Die Materialien können in reiner Form, als Mischungen, Legierungen oder Blends oder in verschiedenen Schichten oder nach Beschichtung beispielsweise mit einem Kunststoff oder einem Lack zur Herstellung der erfindungsgemäßen Träger 25 verwendet werden. Bevorzugt werden transparente Träger aus Quarz, Glas, Kunststoff, Germanium oder Silicium hergestellt, die für alle visuellen Tests wie mikroskopische, kameraunterstützte, laserunterstützte Tests geeignet sind.

- 30 Als transparente Kunststoffe sind alle amorphen Kunststoffmaterialien, die einphasig oder mehrphasig mit gleichen Brechungsindex wie Polymere aus Acrylnitril-Butadienstyrol oder mehrphasig mit unterschiedlichem Brechungsindex, bei denen die Domänen der Kunststoffkomponenten Bereiche bilden, die kleiner 35 als die Wellenlänge des Lichts sind wie beispielsweise die Blockcopolymere aus Polystyrol und Butadien (sog. Polystyrol/Butadienblends) geeignet.

- Als besonders geeignete transparente Kunststoffe seien hier 40 Polystyrol, Styrolacrylnitril, Polypropylen, Polycarbonat, PVC (= Polyvinylchlorid), Polymethylmethacrylat, Polyester, Silicone, Polyethylenacrylat, Polylactid oder Celluloseacetat, Cellulosepropionat, Cellulosebutyrat oder deren Mischungen genannt. Silicium- oder Germaniumträger eignen sich besonders für Anwendungen, bei denen eine Detektion oder Induktion der Reaktion über 45 nahes Infrarotlicht erforderlich ist.

Der erfindungsgemäße Träger kann auch in Form eines Transportbandes ausgeführt sein, das bei Automatisierung der Assays an den Beschickungs-, Inkubations- oder Detektionsstationen vorbeilaufen kann.

5

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Träger geht beispielsweise von Keramik-, Quarz- oder Glasplatten aus. Der Träger wird dazu zweckmäßigerweise zunächst mit einem Reinigungsmittel beispielsweise einem Alkohol, einem alkalischen Reiniger oder einem sauren Reiniger wie Reacalc® (enthält laut Angabe der Firma Chemotec GmbH, Phosphorsäure und Tenside) gesäubert. Zur Verbesserung der Reinigung kann diese vorteilhafterweise in einem Ultraschallbad vorgenommen werden. Nach der Reinigung wird der Träger direkt oder nach Spülung mit Wasser und/oder Alkohol oder mit einem Alkohol/Wassergemisch getrocknet. Die hydrophobe Beschichtung des Trägers erfolgt beispielsweise mit einer 1%igen Hexadecyl-trimethoxy-silanlösung in einem Lösungsmittel wie Isopropanol/H₂O (9:1) mit Hilfe einer Stempeltechnik. Der Stempel wird kurz auf den Glasobjektträger zum Aufbringen der 1%igen Hexadecyl-trimethoxy-silanlösung gedrückt. Anschließend wird der Träger getrocknet. Vorteilhafterweise wird der Glasträger bei erhöhten Temperaturen, das heißt bei Temperaturen größer 80 °C, getrocknet. Vorzugsweise wird der Träger nach Trocknung nochmals zur Entfernung von überschüssigem Hexadecyl-trimethoxy-silan gespült beispielsweise mit einer Alkohol/Wassermischung wie Isopropanol/H₂O (9:1) .

Gegebenenfalls wird mit dieser Stempeltechnik eine zusätzliche Oberflächenladung im Bereich der hydrophilen Meßpunkte aufgebracht. Diese Oberflächenladung kann beispielsweise durch das Aufbringen von Proteinen, sauren oder basischen Polymeren wie Polylysin oder sauren oder basischen Molekülen erzeugt werden.

Zum Aufbringen von Probenmaterial und Reagenzien eignen sich alle Methoden, die Flüssigkeitsmengen zwischen wenigen nl und wenigen µl dosieren können, wie beispielsweise Techniken, die in Tintenstrahl Druckern, sogenannte Ink-Jet-Technologie (siehe DE-A 40 24 544) oder in der Durchfluß-Zytometrie, in sogenannten Zellsortern (Horan, P.K., Wheelless, L.L., Quantitative Single Analysis and Sorting, Science 1977, 198, 149 - 157) verwendet werden. Die Tropfenbildung kann dabei mit piezoelektrischer Zertropfung (Ultraschall), piezoelektrischer Tropfenausschleudung oder Ausschleudung durch Verdampfung (Ink-Jet-Technik) erfolgen. Es können Systeme mit permanenter Tropfenerzeugung oder Systeme, die Tropfen auf Anforderung erzeugen, verwendet werden.

Mit diesen Techniken können einzelne Tröpfchen exakt dosiert und gezielt auf die einzelnen hydrophilen Meßpunkte der Multi-Analysen-Oberfläche des Trägers plaziert werden, indem zum Beispiel der Träger unter einer oder mehreren parallel angeordneten Düsen entsprechend dem Takt der dosierten Flüssigkeit und entsprechend dem vorgegebenen Raster bewegt wird. Ebenso kann auch die Dosier-
5 vorrichtung beispielsweise aus mindestens einer Düse über dem Träger entsprechend dem Takt der dosierten Flüssigkeit und entsprechend dem vorgegebenen Raster bewegt werden.

10 Es können mit diesen Techniken, falls erforderlich, verschiedene Reagentien und/oder einzelne Zellen an die vorgegebenen Orte (= Meßpunkte) auf der Trägeroberfläche plaziert und zur Reaktion gebracht werden. Von Vorteil ist, daß bei den erfindungsgemäß
15 bevorzugten kleinen Volumina im Bereich von einigen Nanoliter bis zu wenigen Mikroliter eine Vermischung der Reaktanten durch Diffusion sehr rasch eintritt, so daß eine besondere mechanische Mischvorrichtung nicht notwendig ist. Es können auch vor der
20 Zugabe von Flüssigkeitströpfchen zur Durchführung der eigentlichen Analyse gewisse Liganden, z. B. Proteine oder Nucleinsäuren, auf dem Träger in adsorbierter oder chemisch gebundener Form vor der Zudosierung der Meßproben und der Reagentien bereits vorliegen.

25 Weitere Vorteile der erfindungsgemäßen Träger sind die Einsparung an Substanzen wie beispielsweise an zu testenden Chemikalien, an Enzymen, an Zellen oder sonstigen Reaktanten, an Zeit durch eine weitere Steigerung gegebenenfalls automatisierter paralleler Reaktionsansätze, an Platz- und Personalbedarf, durch eine
30 weitere Miniaturisierung der Reaktionsansätze und dadurch letztlich auch an Geld.

Die auf den Trägern abgelegten Tröpfchen können auch in Form von Geltröpfchen auf den Träger aufgebracht werden, die sich gegebenenfalls anschließend verfestigen und so die Verdunstung der
35 Reaktionsflüssigkeit verringern.

Die Verdunstung der Reaktionsflüssigkeit (siehe Nummer 3 in den Figuren 3 und 4) kann auch durch Überschichtung mit einer
40 hydrophoben Flüssigkeit (siehe Nummer 4 in den Figuren 3 und 4), wobei die hydrophobe Beschichtung oder Beschichtungen wie ein Anker wirken, verringert werden (Figur 3 und 4). Bevorzugt zur Überschichtung werden niedrigviskose Öle wie Silikonöle verwendet.

45

Die Verdunstung kann auch durch Inkubation der Träger in einer nahezu wasserdampfgesättigten Atmosphäre reduziert werden.

Durch Kühlung der Träger kann die Verdunstung ebenfalls reduziert werden.

Es können einzelne der genannten Elemente zur Verminderung der Verdunstung verwendet werden oder deren Kombinationen.

- 10 Die erfindungsgemäßen Träger eignen sich prinzipiell für alle heute in Mikrotiterplatten durchgeführten Analysemethoden, wie beispielsweise kolorimetrische, fluorimetrische oder densitometrische Methoden. Dabei können die Lichtstreuung, Trübung, wellenlängenabhängige Lichtabsorption, Fluoreszenz, Lumineszenz, Raman-Streuung, ATR (= Attenuated Total Reflection), Radioaktivität, Isotopenmarkierung, pH-Veränderungen oder Ionenverschiebungen vorteilhaft alleine oder in Kombination genutzt und gemessen werden, um hier nur einige der möglichen Meßgrößen zu nennen.
- 15 Als mögliche auf den erfindungsgemäßen Trägern durchführbare Analysemethoden seien hier die Bindung von Antikörper an Antigene, die Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden, die spezifische Spaltung von Substratmolekülen durch Enzyme, die Polymerase-Kettenreaktion ("PCR"), Agglutinationstests oder die Wechselwirkung zwischen verschiedenen oder gleichen Zelltypen wie Enzymassays, Titrationsassays wie Virustitrationsassays, Erythrozyten- oder Plättchenaggregationsassays, Agglutinationsassays mit Latexkügelchen, ELISA- (= Enzyme-linked immunosorbent assay) oder RIA- (= Radioimmunoassay) genannt.
- 30 Die erfindungsgemäßen Träger können beispielsweise in der Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie, im Umweltschutz beispielsweise bei cytotoxikologischen Tests, in der Medizin oder
- 35 der Biochemie eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Träger sind besonders für das Massenscreening geeignet.

- 40 Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen Träger für alle modernen bild erfassenden und bildauswertenden Analysensysteme.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Veranschaulichung der Erfindung, ohne sie in irgendeiner Weise einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung eines erfindungsgemäßen Trägers aus einem Glasobjektträger

5

Zunächst wurde der Glasobjektträger mit einer 20%igen wässrigen Lösung eines sauren Reinigers (Reacalc[®], Firma Chemotec GmbH) in einem Ultraschalltauchbad 10 Minuten gereinigt. Anschließend wurde der Glasobjektträger mit Wasser und danach mit absolutem

10 Ethanol gespült und bei ca. 23 °C getrocknet.

Mit einem Mikrostempel wurde auf dem hydrophilen Träger die hydrophobe Beschichtung in Form von hydrophoben Ringen (siehe Figur 1 bis 4) aufgebracht. Zur Aufbringung der hydrophoben

15 Schicht wurde eine 1%ige Hexadecyl-trimethoxy-silanlösung in Isopropanol/H₂O (9:1) verwendet. Der in die Silanlösung getauchte Stempel wurde kurz - ca. 5 sec. - auf den Träger gedrückt und anschließend wurde der Träger 15 Minuten bei 100 °C getrocknet. Überschüssige Silanlösung wurde durch Eintauchen des Trägers für

20 ca. 1 Minute in Isopropanol/H₂O (9:1) vom Träger entfernt. Es wurden zwei Typen von Stempeln zum Aufbringen von 12 bzw. 25 Meßpunkten pro Quadratzentimeter verwendet.

Beispiel 2

25

Protease-Inhibitor-Assay mit den erfindungsgemäßen Trägern

Mit einem nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren hergestellten Träger wurde ein Protease-Inhibitor-Assay durchgeführt.

30

In einer Kammer mit größer 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurden mit einem Mikro-Dosiersystem von der Firma Microdrop, Norderstedt, auf einem wie oben beschrieben hergestellten Objektträger 96 Proben mit jeweils 100 nl einer Lösung von Fluorescein-

35 isothiocyanat-markiertem Casein (20 µg/ml) in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) aufgebracht. Die Anordnung der Reaktionströpfchen erfolgte entsprechend der durch den Stempel aufgebrachten, hydrophoben Bereiche (= Sperrschichten) in 8 Reihen und 12 Spalten in einem Raster von 2 x 2 mm. Die Breite der hydrophoben

40 Ringe war jeweils 0,4 mm.

Anschließend wurde je 1 nl verschiedener Protease-Inhibitoren in einer 1 mM Konzentration in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) mit dem Microdrop-Gerät zu den Reaktionsproben zugegeben. Die Zugabe

45 erfolgte exakt in die vorher aufgebrachte fluoreszenzmarkierte

Caseinlösung. Als Kontrolle wurde ein Nanoliter 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) verwendet.

Zum Schluß wurden 10 nl der Protease Trypsin in einer Konzentration von 10 mg/ml in Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) zur Reaktion gegeben.

Die Reaktionströpfchen wurden anschließend zur Reduktion der Verdunstung entweder mit Mineralöl, Silikonöl oder mit Paraffin-Öl, das mit dem Microdrop-Dosiersystem aufgebracht wurde, abgedeckt.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde der Assay gemessen. Hierzu wurde von der Objektträgerunterseite mit Hilfe eines Invert-Fluoreszenzmikroskops mit linear polarisiertem Licht im Bereich von 450 bis 485 nm Fluoreszenz angeregt und im Bereich von 515 bis 530 nm detektiert. Zur Detektion diente eine kühlbare CCD-Kamera mit vorgeschaltetem motorisch drehbarem Polarisationsfilter.

Es wurde die Anisotropie der Polarisation der Caseinmoleküle nach folgenden Gleichungen bestimmt:

$$A = \frac{I_{\text{senkrecht}} - I_{\text{parallel}}}{I_{\text{senkrecht}} + 2 \times I_{\text{parallel}}} \quad (\text{I})$$

$$P = \frac{I_{\text{senkrecht}} - I_{\text{parallel}}}{I_{\text{senkrecht}} + I_{\text{parallel}}} \quad (\text{II})$$

hierbei bedeutet:

A	die Anisotropie
P	die Polarisation
I_{parallel}	die gemessene Intensität des Fluoreszenz-Lichtes bei einer Polarisation parallel zur Polarisation des Anregungslichtes und
$I_{\text{senkrecht}}$	die gemessene Intensität des Fluoreszenz-Lichtes bei gekreuzten Polarisationsfiltern

Die Anisotropie ist ein Maß für die rotatorische Diffusionskonstante von Molekülen und kann als Maß zur Abschätzung der hydrodynamischen Molekülgrößen eingesetzt werden (G. Weber, Biochemie, Vol. 51, 1952, 145 - 155).

Wurde das Fluorescein-isothiocyanat-markierte Protein von der Protease gespalten, so wurde eine Polarisation im Bereich von 50 bis 75×10^{-3} gemessen. Wurde die Protease Trypsin inhibiert, so wurde eine Polarisation größer 150×10^{-3} gemessen.

5

Zur parallelen Auswertung aller 96 Reaktionsansätze wurde mit einem Objektiv aus einer Stereo-Lupe das gesamte Meßfeld mit den 96 Meßpunkten gleichzeitig erfaßt und mit einem Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet.

10

Beispiel 3

Protease-Inhibitor-Assay mit 1536 parallelen Meßpunkten

- 15 Es wurde ein Trypsin-Inhibitorassay wie unter Beispiel 2 beschrieben mit 1536 parallelen Meßpunkten auf der Größe einer Mikrotiterplatte (siehe Figur 2) durchgeführt.

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Fester Träger für analytische Meßverfahren, der im wesentlichen aufgebaut ist aus einem inerten festen Trägermaterial, auf dem hydrophile Meßbereiche, die gegebenenfalls mit einer Oberflächenladung versehen sind, durch mindestens eine hydrophobe Beschichtung voneinander getrennt sind, wobei auf dem Träger größer oder gleich 10 Meßpunkte pro cm² aufgebracht sind.
5
2. Fester Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Meßbereiche durch mindestens eine durchgehende hydrophobe Beschichtung voneinander getrennt sind.
10
3. Fester Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die auf dem Träger aufgetragenen hydrophilen Meßbereiche durch unterbrochene hydrophobe Bereiche voneinander getrennt sind.
15
4. Träger nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Trägermaterial Glas, Keramik, Quarz, Metall, Stein, Kunststoff, Gummi, Silicium oder Porzellan verwendet.
20
5. Träger nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein transparentes Trägermaterial ausgewählt aus der Gruppe Glas, Quarz, Silicium oder Kunststoff verwendet.
25
6. Verfahren zur Herstellung eines Trägers gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man den Träger mit mindestens einer hydrophoben Beschichtung versieht und die hydrophilen Meßbereiche mittels Mikrolithographie-, Photoätz-, Mikrodruck- oder Mikrostempeltechnik aufbringt.
30
7. Verfahren zur Herstellung eines Trägers gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man einen hydrophilen oder hydrophilisierten Träger mittels Mikrolithographie-, Photoätz-, Mikrodruck- oder Mikrostempeltechnik in der Weise mit mindestens einer hydrophoben Beschichtung versieht, daß voneinander getrennte hydrophile Meßbereiche entstehen.
35
8. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man in den hydrophilen Meßbereichen des Trägers zusätzlich eine Oberflächenladung aufbringt.
40
- 45

9. Analytisches Meßverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß man auf einem Träger gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 flüssige Analysenproben, die gegebenenfalls mit einer hydrophoben Schicht abgedeckt werden können, in den hydrophilen Meßbereichen auf-
5 bringt und analysiert.
10. Analytisches Meßverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die analytische Messung in nahezu wasserdampfgesättigter Atmosphäre durchführt.
- 10 11. Analytisches Meßverfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die analytische Messung unter Kühlung des Trägers durchführt.
- 15 12. Verwendung eines Trägers gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 in der Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie oder im Umweltschutzbereich.

20

25

30

35

40

45

FIG.1

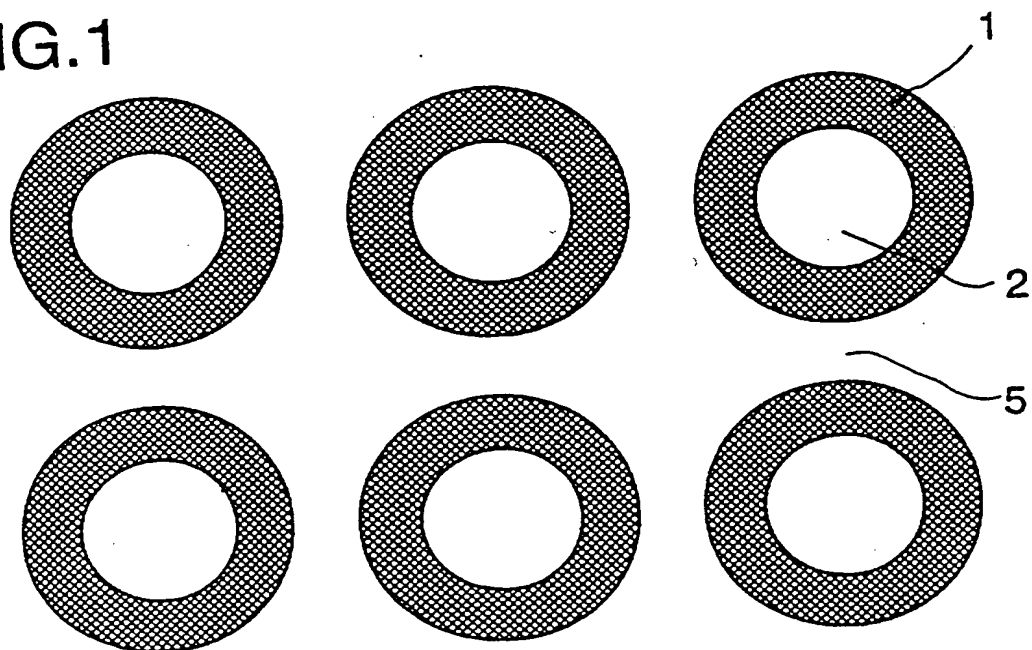


FIG.2

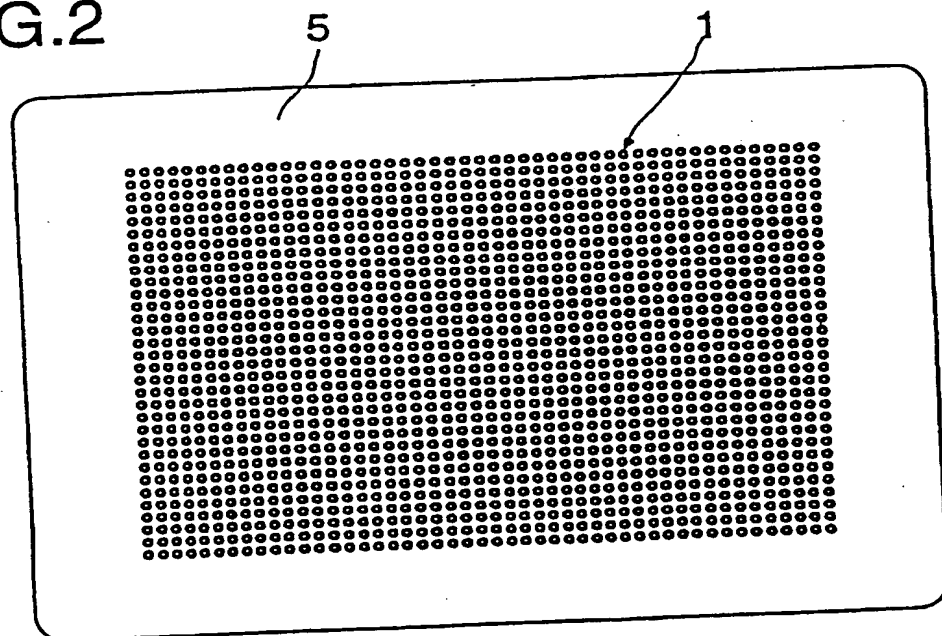


FIG.3

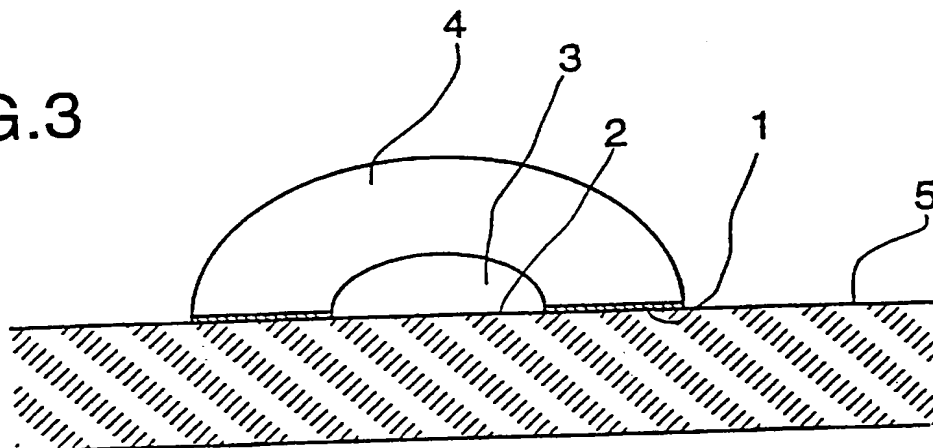
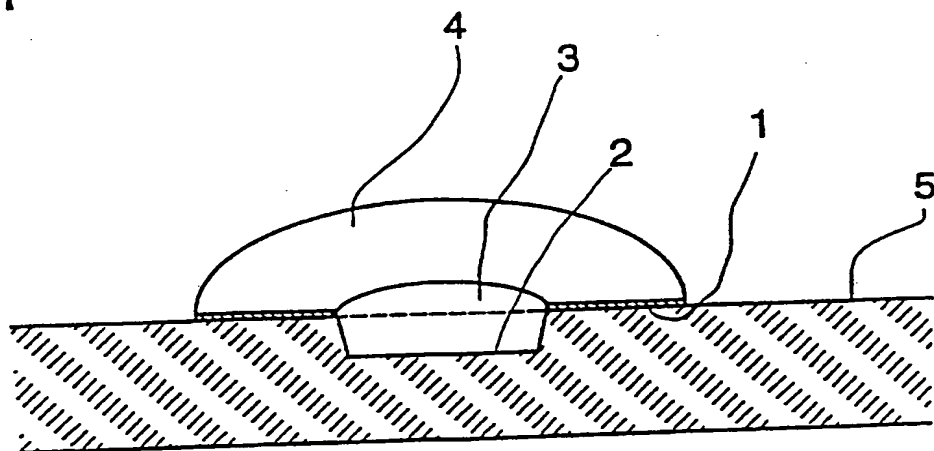


FIG.4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No
PCT/EP 97/03571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01J19/00 B01L3/00 C07K1/04 C07H21/00 C03C17/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 27719 A (BRENNAN THOMAS M) 8 December 1994	1,2,4-8, 12
Y	see page 3, line 7 - page 4, line 9	3
A	see page 4, line 15 - line 34	10
X	see page 7, line 2 - line 17	8
	see page 10, line 25 - line 35; figure 3	
Y	US 4 728 792 A (WARNER GERALD T ET AL) 1 March 1988	3
	see column 1, line 64 - column 2, line 11; claim 14; figure 2	
A	US 5 041 266 A (FOX WILLIAM A) 20 August 1991	9
	see column 4, line 26 - line 34 see column 6, line 16 - line 58; figure 7	
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 1997

Date of mailing of the international search report

24/10/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hocquet, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Application No
PCT/EP 97/03571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 35505 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 28 December 1995	1
A	see page 7, line 30 - line 32	8
A	see page 18, line 29 - line 34	10
A	see page 27, line 1 - line 4	10

A	DE 39 15 920 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 22 November 1990 see column 3, line 13 - line 22; claims 1,3,5 see column 3, line 67 - column 4, line 35 see column 8, line 19 - line 21; claim 15	11

X	MATSUDA T ET AL: "MICROFABRICATED SURFACE DESIGNS FOR CELL CULTURE AND DIAGNOSIS" ASAIO JOURNAL, vol. 40, no. 3, 1 July 1994, pages 594-597, XP000498248 see the whole document	1,12

X	EP 0 402 718 A (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND) 19 December 1990	1,2,4-8, 12
X	see page 2, line 28 - line 50	6,7
X	see page 3, line 4 - line 11	4
X	see page 3, line 12 - line 18; claim 2	8
X	see page 3, line 55 - page 4, line 2; claim 4	7
X	see page 7, line 47 - line 49	6,7
X	see page 8, line 9 - line 13; claim 5	6
X	see page 8, line 53 - line 57	1,12
X	see page 9, line 14 - line 21	1

P,X	WO 97 22875 A (ECOLE POLYTECH ;BEATTIE PAUL DANIEL (CA): BREVET PIERRE FRANCOIS ()) 26 June 1997 see page 9, line 2 - line 7 see page 9, line 24 - line 33	1,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No
PCT/EP 97/03571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9427719 A	08-12-94	US 5474796 A AT 156034 T CA 2163781 A DE 69404657 D EP 0703825 A JP 9500568 T	12-12-95 15-08-97 08-12-94 04-09-97 03-04-96 21-01-97
US 4728792 A	01-03-88	SE 455821 B EP 0203048 A JP 1864610 C JP 61266980 A SE 8502474 A	08-08-88 26-11-86 08-08-94 26-11-86 21-11-86
US 5041266 A	20-08-91	US 5229163 A	20-07-93
WO 9535505 A	28-12-95	AU 2862995 A CA 2192095 A	15-01-96 28-12-95
DE 3915920 A	22-11-90	NONE	
EP 0402718 A	19-12-90	JP 2023897 C JP 3007576 A JP 7051061 B JP 3007577 A DE 69013764 D US 5593814 A US 5202227 A	26-02-96 14-01-91 05-06-95 14-01-91 08-12-94 14-01-97 13-04-93
WO 9722875 A	26-06-97	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Jonaes Aktenzeichen

PCT/EP 97/03571

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 B01J19/00 B01L3/00

C07K1/04

C07H21/00

C03C17/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 27719 A (BRENNAN THOMAS M) 8. Dezember 1994	1, 2, 4-8, 12
Y	siehe Seite 3, Zeile 7 - Seite 4, Zeile 9	3
A	siehe Seite 4, Zeile 15 - Zeile 34	10
X	siehe Seite 7, Zeile 2 - Zeile 17 siehe Seite 10, Zeile 25 - Zeile 35; Abbildung 3	8
Y	US 4 728 792 A (WARNER GERALD T ET AL) 1. März 1988 siehe Spalte 1, Zeile 64 - Spalte 2, Zeile 11; Anspruch 14; Abbildung 2	3
A	US 5 041 266 A (FOX WILLIAM A) 20. August 1991 siehe Spalte 4, Zeile 26 - Zeile 34 siehe Spalte 6, Zeile 16 - Zeile 58; Abbildung 7	9

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Oktober 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/10/1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Hocquet, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/03571

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 35505 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 28.Dezember 1995	1
A	siehe Seite 7, Zeile 30 - Zeile 32	8
A	siehe Seite 18, Zeile 29 - Zeile 34	10
A	siehe Seite 27, Zeile 1 - Zeile 4	10
A	DE 39 15 920 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 22.November 1990	11
	siehe Spalte 3, Zeile 13 - Zeile 22; Ansprüche 1,3,5	
	siehe Spalte 3, Zeile 67 - Spalte 4, Zeile 35	
	siehe Spalte 8, Zeile 19 - Zeile 21; Anspruch 15	
X	MATSUDA T ET AL: "MICROFABRICATED SURFACE DESIGNS FOR CELL CULTURE AND DIAGNOSIS" ASAIO JOURNAL, Bd. 40, Nr. 3, 1.Juli 1994, Seiten 594-597, XP000498248 siehe das ganze Dokument	1,12
X	EP 0 402 718 A (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND) 19.Dezember 1990	1,2,4-8, 12
X	siehe Seite 2, Zeile 28 - Zeile 50	6,7
X	siehe Seite 3, Zeile 4 - Zeile 11	4
X	siehe Seite 3, Zeile 12 - Zeile 18; Anspruch 2	8
X	siehe Seite 3, Zeile 55 - Seite 4, Zeile 2; Anspruch 4	7
X	siehe Seite 7, Zeile 47 - Zeile 49	6,7
X	siehe Seite 8, Zeile 9 - Zeile 13; Anspruch 5	6
X	siehe Seite 8, Zeile 53 - Zeile 57	1,12
X	siehe Seite 9, Zeile 14 - Zeile 21	1
P,X	WO 97 22875 A (ECOLE POLYTECH :BEATTIE PAUL DANIEL (CA); BREVET PIERRE FRANCOIS () 26.Juni 1997 siehe Seite 9, Zeile 2 - Zeile 7 siehe Seite 9, Zeile 24 - Zeile 33	1,9